昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, January 2015, 58(1): 28 – 37 doi:10.16380/j.kcxb.2015.01.004

# 脂多糖诱导的水椰八角铁甲免疫响应动态及其在性别间的差异

冯珊珊，侯有明*

（福建农林大学植物保护学院，福建省昆虫生态重点实验室，农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室，福州 350002）

**摘要：**【目的】研究昆虫免疫诱导后的响应模式是揭示昆虫免疫适应性变异、免疫权衡和免疫致敏现象的关键。本研究旨在探讨水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*（Maulik）免疫诱导的动态响应变化及其在性别间的差异。【方法】将革兰氏阴性细菌细胞壁提取物脂多糖(LPS)注射到水椰八角铁甲雌雄成虫体腔内，诱导其免疫系统响应，测定了两个重要免疫参数酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性和抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)抑菌活性在免疫诱导前后的动态变化。【结果】LPS(2.5 mg/mL × 138 nL)诱导可以使水椰八角铁甲 PO 活性和 AMPs 的抑菌活性在一定时间范围内(雌虫 PO 活性和 AMPs 抑菌活性分别在诱导后 4 – 10 h 和 12 – 48 h，雄虫 PO 活性和 AMPs 抑菌活性分别在诱导后 0.1 – 10 h 和 4 – 48 h)显著高于空白对照；AMPs 抑菌活性的提升时间迟于 PO 活性。但持续时间长于 PO 活性。免疫诱导前，成虫的 PO 活性和 AMPs 抑菌活性均是雌性显著高于雄虫；同样在免疫诱导后，成虫 PO 活性和 AMPs 抑菌活性的最高水平也是雌性显著大于雄虫，但活性提升的时间是雄性早于雌虫。【结论】LPS 能够显著诱导水椰八角铁甲雌雄成虫的免疫响应，而且雌成虫的免疫响应明显高于雄性。通过对水椰八角铁甲免疫物质动态变化的认识，为水椰八角铁甲入侵到新生境后免疫相关适应性变异及安全有效的生物防治方法的研究奠定了基础。

**关键词：**水椰八角铁甲；免疫诱导；脂多糖；抗菌肽；PO 活性；抑菌活性；性别差异

**中图分类号：**Q968 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2015)01-0028-10

# Lipopolysaccharide-induced immune response of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) adults in relation to their genders

FENG Shan-Shan, HOU You-Ming* (Key Laboratory of Insect Ecology in Fujian, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Fujian-Taiwan, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** 【Aim】Understanding the response patterns of insects after immunity induction is a basis to reveal the mechanisms of adaptive immune response, immune trade-offs and immune priming. The study aims to clarify the dynamic changes of the immune response in *Octodonta nipae* (Maulik) adults induced by bacteria and the response differences between males and females. 【Methods】The cell-wall extract lipopolysaccharide (LPS) of gram negative bacteria was injected into the body cavity of *O. nipae* adults to induce their immune response. The activities of phenoloxidase (PO) and antimicrobial peptide (AMPs), which play an important role in insect innate immunity, were assayed at different time post induction. 【Results】The PO activity and the antibacterial activity of AMPs in *O. nipae* adults were significantly induced by 2.5 mg/mL × 138 nL LPS in a certain time period, and the response models were different between females and males. The PO activities in LPS-induced female (4 – 10 h post induction) and male adults (0.1 – 10 h post induction), as well as the antibacterial activity of AMPs in LPS-induced female (12 – 48 h post induction) and male adults (4 – 48 h post induction), were significant higher than those of the blank control, respectively. LPS induced a faster increase of PO activity than of AMPs activity, but the increase of AMPs activity lasted for a longer time. Before immune induction, the PO activity and the antibacterial activity of AMPs in female adults were significant higher than those in male adults; and after immune induction the PO activity and the antibacterial activity of AMPs in female adults also had a higher

基金项目：国家自然科学基金项目(31272108, 31471829)

作者简介：冯珊珊，女，1989 年 10 月生，河北省石家庄人，硕士研究生，主要从事入侵生物学研究，E-mail：shanshanet@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：ymhou@fafu.edu.cn

收稿日期 Received：2014-09-02；接受日期 Accepted：2014-12-29

top level. 【Conclusion】The results suggest that LPS can induce a dynamic immune response in *O. nipae* adults, which is different between males and females. Our findings provide a foundation for further studies on adaptive immune response of *O. nipae* in the new invading environment and to develop an effective strategy to control *O. nipae*.

**Key words**: *Octodonta nipae*; immune induction; lipopolysaccharide; antimicrobial peptide; phenoloxidase activity; antibacterial activity; gender difference

昆虫具有特殊的免疫防御系统，只有先天性免疫而无获得性免疫，缺乏抗原-抗体特异性（Siva-Jothy *et al.*, 2005）。当昆虫受到免疫诱导后，主要依靠酚氧化酶（phenoloxidase, PO）依赖性黑素化系统和抗菌肽（antimicrobial peptides, AMPs）合成系统发挥免疫功能（吕鸿声, 2008）。酚氧化酶又称酪氨酸酶，在昆虫防御反应中起重要的作用，通常是以无活性的酶原（prophenoloxidase, PPO）形式存在于昆虫体壁、血淋巴、血细胞和中肠等组织中（Theopold *et al.*, 2004），主要通过参与昆虫表皮的硬化和黑化来防止微生物入侵，并通过参与血细胞凝集反应形成结节或包囊消除侵入昆虫体内的病原物进行免疫防御。抗菌肽是一类具有分子量低、热稳定和广谱性等特点的免疫物质（宫霞等, 2004），主要通过 Toll 途径或 Imd 途径由昆虫脂肪体合成并释放到血淋巴中发挥功能（Lazzaro, 2008），其活性可以通过血淋巴体外抑菌活性来体现。PO 和 AMPs 是昆虫免疫系统的重要组分，二者活性常被用作昆虫免疫系统活性的评价指标（Hoffmann *et al.*, 1999; Schmid-Hempel, 2005），也有研究认为昆虫免疫系统各种组分间存在物质和能量的权衡，免疫发生过程中二者响应的时间差会导致二者的活性在部分时间段呈负相关（Cotter *et al.*, 2004; Simmons and Roberts, 2005; McNamara *et al.*, 2013）。因此为了更有效地反映昆虫免疫系统的活性水平，二者的活性关系需要从动态的角度进行分析。

昆虫免疫系统的激活水平主要受免疫诱导物和诱导剂量的影响，脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分，它可以诱导昆虫免疫活性提升已经被多次证实并普遍应用在昆虫免疫研究领域，但具体激活情况受多种因素限制。例如，McNamara 等（2013）发现 LPS 可诱导棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 3 龄幼虫 PO 活性和血淋巴抑菌活性在 24 h 后均显著上调，但只能诱导 6 龄幼虫血淋巴抑菌活性上调，而 PO 活性不发生上调；Zanchi 等（2012）发现 LPS 可诱导黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. 血淋巴抑菌活性在一周之内显著高于正常水平。此外，Wu 等（2014）发现免疫诱导后大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 幼虫的免疫抵抗力与诱导剂量呈正相关。

水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*（Maulik），属于鞘翅目（Coleoptera），叶甲科（Chrysomelidae），原产于马来西亚（Maulik, 1921），是近年来入侵我国南方地区的重要检疫性害虫之一（孙江华等, 2003; Hou and Weng, 2010; Hou *et al.*, 2014a, 2014b），已对入侵地区的棕榈科植物造成了很大的威胁（侯有明等, 2011; 席博等, 2013; 华瑞香等, 2014）。在该入侵害虫的控制中，由于其危害部位隐蔽，化学农药防治很难奏效，因此寻求生物防治的措施显得尤为重要。前期的研究发现，金龟子绿僵菌小孢的一个变种 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 对水椰八角铁甲有很强的致病性（徐利等, 2011），椰心叶甲啮小蜂 *Tetrastichus brontispae* Ferrière 对水椰八角铁甲的蛹有很好的寄生效果（黄山春等, 2007; Tang *et al.*, 2014a, 2014b）。病原菌感染或寄生蜂寄生主要通过攻击昆虫免疫系统致死昆虫，同时昆虫也会分泌多种免疫防御物质来抵御病原菌或寄生物，宿主昆虫消除这些病菌或寄生物后，会经各种途径转化降解这些防御物质，以恢复至正常水平，防止这些物质的过度积累对自身生长发育、繁殖等造成损害，整个过程会在昆虫体内持续一段时间并消耗大量能量（González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012）。同时，由于昆虫雌雄个体的生活史特性存在很大差异，能量的储备和投资策略也各不相同，因此我们推测昆虫免疫防御水平在性别间也存在差异。

本实验通过选取相同饲养条件下、相同日龄、未交配的水椰八角铁甲雌雄成虫，以 LPS 诱导模拟细菌感染进行免疫诱导，从动态的角度研究了免疫诱导后 PO 活性和 AMPs 抑菌活性在水椰八角铁甲体内的变化情况及这种变化在性别间的差异，为进一步揭示水椰八角铁甲入侵后免疫相关适

应性变异、免疫权衡和免疫致敏的机理等奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

供试水椰八角铁甲成虫采自福建省福清市(25.42°N,119.23°E)的棕榈科植物,在福建农林大学害虫生态控制研究室人工气候箱中(宁波海曙赛福实验仪器厂,PRX-250B)累代饲养 6 代(25 ± 0.5℃,RH 80% ±5%,光周期 12L∶12D)。幼虫在 12 cm×24 cm 的塑料保鲜盒内饲养,盒盖用手术刀片点出多排透气孔,将鲜嫩的寄主棕榈科植物加拿利海枣 *Phoenix canariensis* Hort *ex* Chabaud 心叶用橡皮筋捆扎成束放置于保鲜盒内饲喂,每日更换新叶片。成虫羽化后转入 150 mL 的塑料培养瓶内饲养,瓶盖中心有透气孔,雌雄分开饲养。选取羽化后 23 日龄的性成熟未交配的雌雄成虫个体进行实验。

### 1.2 免疫诱导

将虫体用 75% 的酒精消毒后,在体视显微镜下采用 WPI 注射系统(World Precision Instruments, Inc.)注射免疫诱导液。WPI 注射系统配备原装进口毛细管,用快速拉针仪两步法(第 1 步温度 45℃,第 2 步温度 30℃)将毛细管拉成针头用于注射,每滴体积为 69 nL。采用大肠杆菌 *Escherichia coli* 细胞壁提取物脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma: L2755)为免疫诱导剂(Moret and Schmid-Hempel, 2000),pH 7.4 的无菌林格氏液(Ringer's solution, RS)作为阴性对照,以正常饲养的成虫作为空白对照(blank control, BC)。

为了尽可能降低免疫注射对昆虫存活的影响,同时还要有效地激活昆虫免疫系统,在注射前需要选取最佳的免疫诱导剂量。参考 Moret 和 Schmid-Hempel(2000)以及 Wu 等(2014)的方法,用标准的 RS 溶液将 LPS 稀释至 0.5,2.5 和 12.5 mg/mL 3 个浓度梯度,以注射同体积的 RS(0 mg/mL LPS)为阴性对照,以不注射的为空白对照,每次注射 1 滴(体积为 69 nL)。每个处理雌雄各 10 头,重复 3 次。注射后每隔 12 h 记录一次存活率,当各组处理存活率达到稳定后,选取成虫存活率大于 90% 的最大注射浓度为后续的诱导注射浓度;用选定的 LPS 注射浓度,通过逐步增加注射体积的方式(69,138 和 207 nL)增大 LPS 诱导剂量,同时以注射相同体积的 RS 为对照。每个处理雌雄各 10 头,重复 3 次。注射后每隔 12 h 记录一次存活率,当各组存活率稳定后,选取成虫存活率大于 90% 的最大注射体积为后续的诱导注射体积。

以选定的诱导注射浓度和体积,分别对雌雄成虫个体进行以下诱导处理:♀(BC),♀(RS),♀(LPS),♂(BC),♂(RS)和♂(LPS)。BC 代表空白对照,RS 代表注射林格氏液,LPS 代表注射脂多糖。注射处理后,雌雄成虫个体仍然分开饲养,防止交配。在免疫诱导后的不同时间段测定雌雄个体酚氧化酶活性和抑菌活性等。

### 1.3 酚氧化酶(PO)活性的测定

样品制备和检测均参照 Laughton 和 Siva-Jothy(2011)的方法并改进。

样品制备:分别取免疫诱导后不同时间(0.1,2,4,6,8,10,12,24,36 和 48 h)的雌雄成虫,表面消毒后分别将每头虫体放入 1.5 mL 离心管中,在 -80℃冰箱(美国热电公司)中冷冻保存。取冷冻致死的成虫,加入 140 μL 无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),冰上研磨,高速离心(4℃,10 000 r/min)10 min 后,取上清液,在 -20℃冰箱保存过夜后待测。各组处理每个时间点的样本量见表 1。

**表 1 PO 活性测定的每个处理样本量**

**Table 1 Sample size of each treatment for the detection of the PO activity**

| 处理 Treatments | 诱导后时间 Time post LPS induction (h) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 24 | 36 | 48 |
| ♀BC | 27 | 29 | 30 | 23 | 22 | 23 | 24 | 22 | 27 | 25 |
| ♀RS | 25 | 25 | 29 | 27 | 30 | 24 | 24 | 26 | 27 | 24 |
| ♀LPS | 30 | 23 | 30 | 27 | 27 | 30 | 27 | 25 | 28 | 25 |
| ♂BC | 25 | 27 | 27 | 25 | 27 | 25 | 30 | 25 | 27 | 24 |
| ♂RS | 28 | 28 | 29 | 28 | 26 | 24 | 25 | 23 | 25 | 25 |
| ♂LPS | 28 | 27 | 30 | 29 | 27 | 30 | 29 | 25 | 27 | 24 |

样品检测:将待测样品转入 4℃冰箱自然融化,用多功能酶标仪(Molecular Devices, SpectraMax 190)检测 PO 活性。反应体系为:20 μL PBS+140 μL 无菌水+20 μL 样品提取液+20 μL 左旋多巴(L-DOPA, 4 μg/μL);30℃,20 min,490 nm 处每 15 s 读数一次。读取 PO 与 L-DOPA 发生黑化反应的最大反应速率 $V_{max}$(即样品吸光度 OD 值变化的最大速率),以 $V_{max}$ 的大小反映 PO 活性强弱。

### 1.4　AMPs 抑菌活性测定

在超净工作台中，将活化的大肠杆菌 *E. coli* DH5α，在培养皿内划线培养，挑单个菌落于 40 mL 无菌 LB 培养基（pH 7.4）内，37℃恒温震荡培养 4 h 扩繁后作为实验用菌。

抗菌肽（AMPs）粗提液制备：参照陆婕等（2007）的加热层析法并改进。取免疫诱导后不同时间（0，4，8，12，24，48，72 和 96 h）的雌雄成虫，表面消毒后将单头分别移入 1.5 mL 无菌离心管中，放入 −80℃冰箱冷冻保存。向冷冻后含有虫体的离心管中加 100 mL PBS 和 2.5 μL 0.01 % 苯基硫脲（phenylthiourea，PTU）后，充分研磨，60℃条件下水浴 30 min，然后 8 000 r/min 常温离心 10 min，取上清液待测。各组每个时间点的样本量见表 2。

**表 2　AMPs 抑菌活性测定的每个处理样本量**

**Table 2　Sample size of each treatment for the detection of the antibacterial activity of AMPs**

| 处理 Treatments | 诱导后时间 Time post LPS induction (h) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| ♀ BC | 28 | 28 | 25 | 25 | 29 | 26 | 28 | 24 |
| ♀ RS | 28 | 29 | 27 | 30 | 28 | 30 | 28 | 23 |
| ♀ LPS | 26 | 30 | 26 | 30 | 28 | 28 | 28 | 26 |
| ♂ BC | 26 | 29 | 25 | 26 | 26 | 29 | 29 | 27 |
| ♂ RS | 27 | 28 | 26 | 24 | 24 | 26 | 26 | 24 |
| ♂ LPS | 24 | 27 | 24 | 27 | 27 | 27 | 30 | 25 |

正常大肠杆菌生长量的测定：参考 Login 等（2011）的方法并改进。在 100 μL 液态无菌 LB 培养基中加入 20 μL PBS 和 20 μL 菌液，在 37℃条件下培养 12 h（大肠杆菌处于对数生长期），在培养 0 h 和 12 h 时，采用多功能酶标仪（Molecular Devices，SpectraMax 190）各测量一次 $OD_{600}$ 值，其差值即为大肠杆菌的正常生长量 $\delta_1$；样品抑制条件下大肠杆菌的生长量测定：在 100 μL 无菌 LB 培养基中加入 20 μL AMPs 粗提液样品和 20 μL 菌液，同样在 37 ℃条件下培养 12 h，在培养 0 h 和 12 h 时，采用多功能酶标仪各测量一次 $OD_{600}$ 值，差值即为大肠杆菌的生长量 $\delta_2$。AMPs 粗提液样品对大肠杆菌的抑制量 $\Delta OD_{600} = \delta_1 - \delta_2$。

### 1.5　数据处理

本实验中注射不同剂量免疫诱导物后雌雄个体在 60 h 时的存活率差异和不同处理在不同时间点 PO 活性和 AMPs 抑菌活性差异采用 SPSS21 软件的 ANOVA（$P < 0.05$）分析，采用 Tamhane 氏 T2 法进行多重比较；PO 活性和 AMPs 抑菌活性在雌虫和雄虫间的差异均采用独立样本 *t* 检验。均值采用平均数 ± 标准误（mean ± *SE*）。

## 2　结果与分析

### 2.1　LPS 免疫诱导浓度和体积的选择

免疫诱导试验表明，在注射 LPS 后 60 h，所有处理组的雌雄成虫存活率保持稳定，且注射不同浓度和体积的 LPS 后，雌雄成虫的存活率差异显著（图 1）。由图 1（A）可知，当 LPS 注射体积为 69 nL 时，注射浓度在 2.5 mg/mL 及以下时，各处理组间成虫存活率均大于 90%，且无显著差异（$P > 0.05$），而当注射浓度达到12.5mg/mL时，雌、雄虫的存活

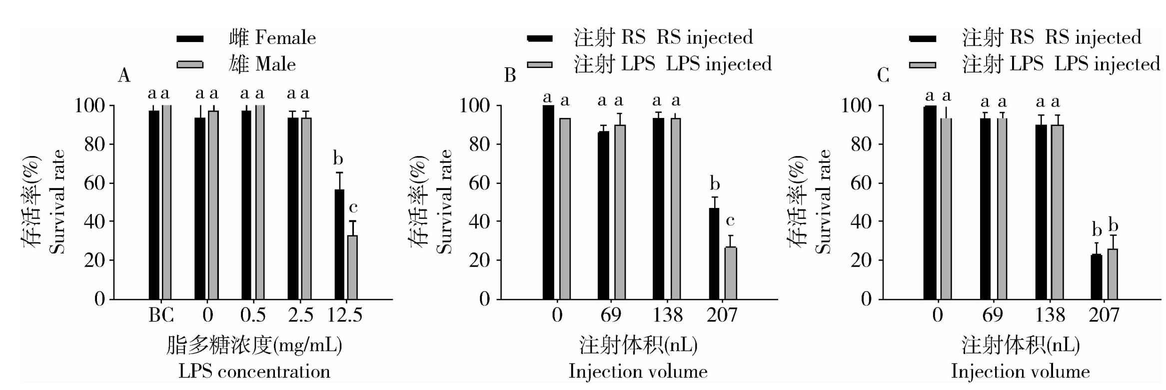



图 1　注射不同浓度（A）和不同剂量（B，C）LPS 60 h 后水椰八角铁甲雌雄成虫的存活率

Fig. 1　Survival rates of male and female adults of *Octodonta nipae* injected with different concentrations (A) and doses (B and C) of LPS for 60 h

A：注射体积 Injection volume 69 nL；B，C：注射浓度 Injection concentration 2.5 mg/mL（B：雌 Female；C：雄 Male）. BC：空白对照 Blank control. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示差异显著（$P < 0.05$，ANOVA）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars mean significant difference ($P < 0.05$, ANOVA).

率显著降低，分别降低到 56.67% ±8.82%（$P<0.01$）和 33.3% ±6.67%（$P<0.01$）。由图 1（B，C）可知，在注射浓度为 2.5 mg/mL 时，注射体积在 138 nL 及以下时，各处理组的雌雄成虫存活率均大于 90%，且无显著差异（$P>0.05$），而当注射体积增加到 207 nL 时，雌虫 RS 组和 LPS 组的存活率显著降低，分别降低到 46.67% ±6.67%（$P<0.01$）和 26.67% ±6.67%（$P<0.01$）（图 1：B），雄虫 RS 组和 LPS 组的存活率也显著降低，分别降低到 23.33% ±6.67%（$P<0.01$）和 26.67% ±6.67%（$P<0.01$）（图 1：C）。为了最大程度激活水椰八角铁甲的免疫系统，减轻注射对雌雄成虫存活率的影响，我们选取的 LPS 免疫诱导浓度为 2.5 mg/mL，诱导体积为 138 nL，因此诱导剂量为 2.5 mg/mL × 138 nL。

## 2.2 免疫诱导后水椰八角铁甲雌雄个体 PO 活性动态变化及差异

由图 2 可知，非诱导情况下（空白对照组），所有时间点的总样本中雌虫的 PO 活性为雄虫的 4.19 倍（雌虫 23.10 ± 0.35，雄虫 5.51 ± 0.20，$t=44.165$，$P=0.000$），且雌、雄个体各自的 PO 活性在 48 h 内均无显著差异；LPS（2.5 mg/mL × 138 nL）诱导后，雌（图 2：A）雄（图 2：B）个体的 PO 活性在一段时间内均显著高于对照组（雌虫：4 – 10 h，雄虫：0.1 – 10 h）（图 2，表 3），且雄虫 PO 活性提升比雌虫早（雄虫自 0.1 h 开始显著高于对照组，而雌虫自 4 h 后开始显著高于对照组），雌雄个体免疫诱导后 PO 活性均在 6 h 处达到最高值，10 h 后逐渐恢复至正常水平，雌虫 PO 活性的最大值是雄虫的 2.56 倍（雌虫 30.98 ±0.95，雄虫 12.08 ±0.82，$t=15.12$，$P=0.000$）；RS 处理后雌虫 PO 活性在 8 h 也有显著提高，其他时段与空白对照组无显著差异，雄虫 PO 活性在 2 h 有显著提高，其他时段与空白对照组无显著差异（图 2）。

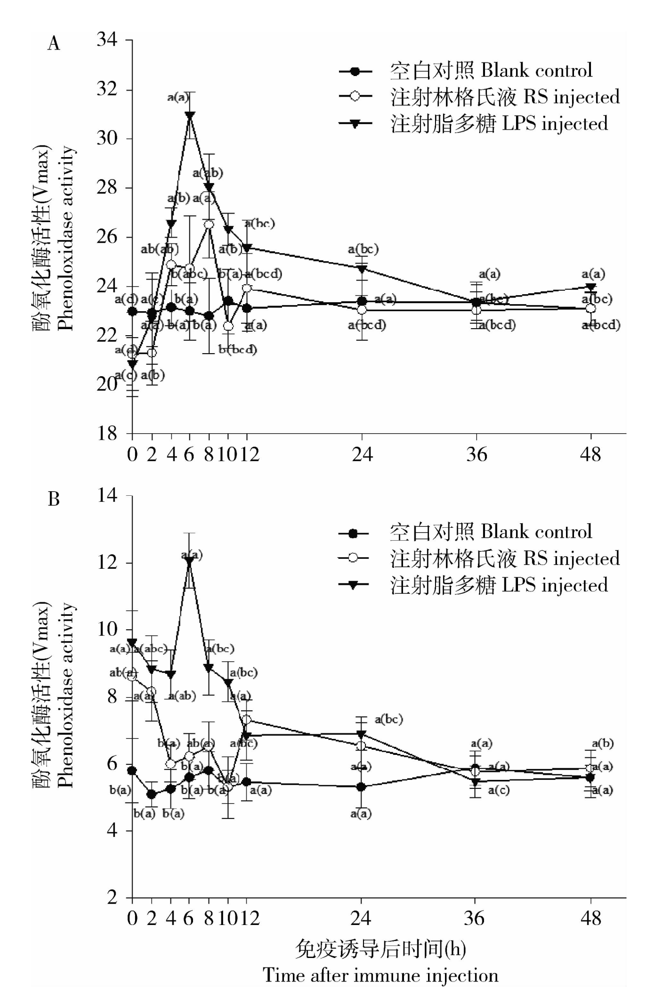



图 2 LPS（2.5 mg/mL × 138 nL）免疫诱导后水椰八角铁甲雌（A）、雄（B）成虫 PO 活性的动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of the phenoloxidase activities in female (A) and male (B) adults of *Octodonta nipae* induced by 2.5 mg/mL × 138 nL LPS

图中数据为平均值 ± 标准误；括号外不同字母表示相同时间点不同处理间差异显著，括号内不同字母表示相同处理不同时间点差异显著（$P<0.05$，ANOVA）；图 3 同。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters outside parentheses indicate significant difference among different treatments at the same time, while those inside parentheses indicate significant difference at different time in the same treatment ($P<0.05$, ANOVA). The same for Fig. 3.

**表 3 LPS（2.5 mg/mL × 138 nL）免疫诱导后不同时间水椰八角铁甲雌雄成虫 PO 活性差异的显著性分析**

**Table 3 Significance analysis of difference in the phenoloxidase activities in female and male adults of *Octodonta nipae* induced by 2.5 mg/mL × 138 nL LPS for different time**

| 性别 Sex | 指标 Index | 诱导后时间 Time post LPS induction (h) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 24 | 36 | 48 |
| ♀ | *df*1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | *df*2 | 79 | 74 | 86 | 74 | 76 | 74 | 72 | 70 | 79 | 71 |
| | *F* | 0.794 | 0.350 | 5.612 | 7.341 | 4.365 | 3.158 | 0.198 | 1.215 | 0.055 | 0.513 |
| | *P* | 0.456 | 0.706 | 0.005 | 0.001 | 0.016 | 0.008 | 0.308 | 0.303 | 0.946 | 0.601 |
| ♂ | *df*1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | *df*2 | 78 | 79 | 83 | 79 | 77 | 76 | 81 | 70 | 76 | 70 |
| | *F* | 5.107 | 6.058 | 8.174 | 24.919 | 5.118 | 5.772 | 2.301 | 2.026 | 0.182 | 0.091 |
| | *P* | 0.008 | 0.003 | 0.001 | 0 | 0.008 | 0.005 | 0.107 | 0.140 | 0.834 | 0.913 |

### 2.3 免疫诱导后水椰八角铁甲雌雄个体 AMPs 抑菌活性的动态变化及差异

由图 3 可知，非免疫诱导条件下（空白对照组），在所有时间点的总样本中雌虫体内 AMPs 对 *E. coli* 的抑菌活性约为雄虫的 2.15 倍（雌、雄虫的 $\Delta OD_{600}$ 分别为 $0.099 \pm 0.003$ 和 $0.046 \pm 0.003$，$t = -11.681$，$P = 0.000$），且雌雄虫各自的 $\Delta OD_{600}$ 在免疫诱导 96 h 内无显著差异。LPS（2.5 mg/mL ×138 nL）免疫诱导后，雌（图 3：A；表 4）雄（图 3：B；表 4）个体 AMPs 抑菌活性在一段时间内显著高于对照组（雌虫：12－48 h，雄虫：4－48 h），但雄虫在免疫诱导后 AMPs 对 *E. coli* 的抑菌活性提升比雌虫早（雄虫自 4 h 开始显著高于对照组，雌虫自12 h 开始显著高于对照组），雌虫在免疫诱导 24 h后抑菌活性达到最大，72 h 后降低到正常水平（图 3：A），而雄虫在免疫诱导 12 h 后抑菌活性到达最大，72 h 后降低到正常水平（图 3：B），但雌虫 AMPs 抑菌活性的最大值是雄虫的 1.39 倍（雌、雄虫的 $\Delta OD_{600}$ 最大值分别为 $0.16 \pm 0.01$ 和 $0.11 \pm 0.01$，$t = -2.79$，$P = 0.007$）。注射 RS 对成虫 AMPs 的抑菌活性也起到了一定的促进作用，RS 处理后雌、雄虫的 AMPs 抑菌活性分别在 12－48 h 和 4－48 h 时间段内显著高于 BC 组（图 3：A，B）。

对比图 2 和图 3，我们还可以发现，无论是雌虫还是雄虫，其 AMPs 抑菌活性的提升时间均比 PO 活性的提升时间晚，但持续时间长（雌虫：PO活性在 4－10 h 时间段提高，而 AMPs 抑菌活性在 12－48 h时间段增大；雄虫：PO 活性在 0.1－10 h 时间段提高，而 AMPs 抑菌活性在 4－48 h 时间段增大）。

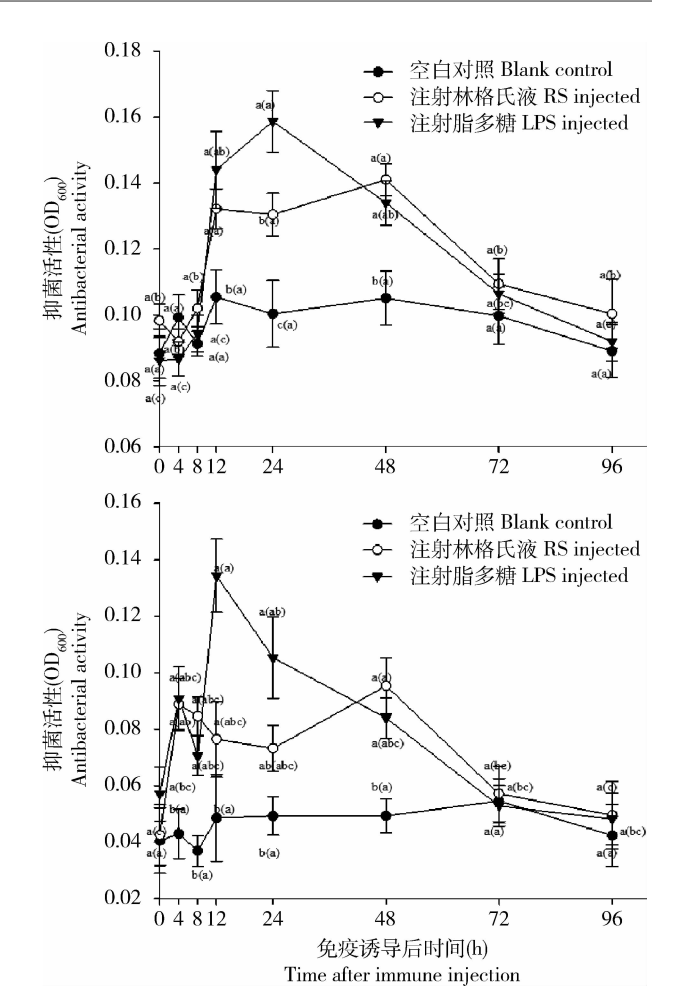



图 3 LPS（2.5 mg/mL ×138 nL）免疫诱导后水椰八角铁甲雌（A）、雄（B）成虫 AMPs 抑菌活性的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes in the antibacterial activities of the AMPs in female (A) and male (B) adults of *Octodonta nipae* induced by 2.5 mg/mL ×138 nL LPS

**表 4 LPS（2.5 mg/mL ×138 nL）免疫诱导后不同时间水椰八角铁甲雌雄成虫的 AMPs 抑菌活性差异的显著性分析**

**Table 4 Significance analysis of difference in the antibacterial activities of the AMPs in female and male adults of *Octodonta nipae* induced by 2.5 mg/mL ×138 nL LPS for different time**

| 性别 Sex | 指标 Index | 诱导后时间 Time post LPS induction (h) 0 | 4 | 8 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ♀ | $df_1$ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | $df_2$ | 79 | 84 | 75 | 82 | 82 | 81 | 81 | 70 |
| | *F* | 0.918 | 1.418 | 1.219 | 4.562 | 10.985 | 8.012 | 0.435 | 0.419 |
| | *P* | 0.404 | 0.248 | 0.301 | 0.013 | 0.000 | 0.001 | 0.649 | 0.614 |
| ♂ | $df_1$ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | $df_2$ | 74 | 81 | 72 | 74 | 74 | 79 | 82 | 73 |
| | *F* | 0.680 | 7.921 | 14.938 | 5.718 | 7.270 | 16.015 | 0.065 | 0.130 |
| | *P* | 0.510 | 0.001 | 0.000 | 0.005 | 0.001 | 0.000 | 0.937 | 0.879 |

## 3 讨论

本实验为了使免疫诱导物在减轻对水椰八角铁

甲存活影响的前提下充分激活其免疫系统,采用了不同浓度和体积的 LPS 对成虫进行免疫诱导,发现免疫诱导 60 h 后各组存活率达到稳定值,并在此基础上选取水椰八角铁甲存活率在 90% 以上的最大注射剂量(2.5 mg/mL × 138 nL LPS)为后续的免疫诱导剂量。注射后发现,LPS 处理和 RS 处理都会导致水椰八角铁甲 PO 活性和 AMPs 抑菌活性的上调,但 RS 组的上调情况只是短时间、低水平的,这也证实了相关研究中报道的病原菌入侵和单纯的外伤都会激活水椰八角铁甲免疫系统,但这两种情况下免疫系统的激活程度不同(Bidla *et al*., 2005)。

本研究结果表明,LPS 诱导后 PO 和 AMPs 活性都是先提升再降低最后恢复至稳定水平,PO 活性在雌雄虫体内的提升时间均早于 AMPs 的提升时间,但 PO 活性提升的持续时间均短于 AMPs 活性提升的持续时间。这种现象主要与二者参与免疫响应的阶段不同有关。昆虫免疫反应可以分为 3 个阶段(吕鸿声, 2008):第 1 阶段为免疫诱导期,历时短,昆虫主要通过动员自身的抗寄生物质和 PPO 级联组分中的抗微生物物质等抵御大部分的入侵病原菌或寄生物;第 2 阶段为可诱导免疫蛋白的合成期,此时血淋巴内可诱导免疫蛋白产生并协助细胞免疫应答共同抵抗第一阶段残存下的入侵物;第 3 阶段为体液免疫应答效应期,该时期历时可达数天,昆虫的免疫基因激活并表达,免疫物质积累用于消除前两个时期残存的入侵物,最终宿主康复或死亡。PO 主要参与前两个阶段且持续时间较短,AMPs 参与第 3 个阶段持续时间长。Theopold 等(2002, 2004)也证实了 PO 介导的血淋巴凝集反应是发生在体液免疫响应之前参与修复伤口和/或吸附入侵物等;Bidla 等(2005)在果蝇幼虫中也证实了 PO 并不能直接消灭病原菌,因此侵入昆虫体内的病原菌需要血淋巴中 AMPs 等其他免疫物质来抵御。

同时,我们还发现水椰八角铁甲免疫诱导后活性动态在性别之间存在很大差异。免疫诱导前,雌虫的 PO 活性和 AMPs 活性都显著高于雄虫(雌虫 PO 活性为雄虫的 4.19 倍,雌虫 AMPs 活性为雄虫的 2.15 倍)。这种差异也存在于多种昆虫中,人们普遍认为这与昆虫的物质能量储存相关,例如雌性果蝇的免疫活性高于雄性(Nunn *et al*., 2009)与其有较多的白细胞相关;双斑蟋蟀 *Gryllus bimaculatus* de Geer 中体型较大的雌虫个体免疫水平相对较高(Rantala and Roff, 2005);红脂大小蠹 *Dendroctonus valens* LeConte 中雌虫的 PO 活性高于雄虫也与体重相关(Shi and Sun, 2010);举尾虫 *Panorpa vulgaris* Imhoff and Labram 中体重较大的雌虫血淋巴中提取的溶菌酶抑菌活性和体外模拟的吞噬作用均显著高于雄虫(Kurtz *et al*., 2000);昆士兰果蝇 *Bactrocera tryoni* Froggatt 中雌虫蛋白质含量高于雄虫导致雌虫的 PO 活性也显著高于雄虫(Fanson *et al*., 2013)。水椰八角铁甲的雌虫体型比雄虫大,雌、雄虫平均体长分别为7.0692 ± 0.0376 mm 和 6.2824 ± 0.0354 mm(Hou and Weng, 2010),平均体重分别为 8.7 ± 0.5 mg 和 6.6 ± 0.5 mg,但是否体型较大的雌虫储存的能量物质影响到了它的免疫活性,以及通过怎样的途径来影响这些免疫物质的活性等仍有待进一步的研究。同时,也有研究表明,雌雄个体免疫活性的差异与它们的繁殖等生活史特性相关,雌雄个体在繁殖过程中性选择的地位、交配竞争模式和配子投入的差异等会导致它们免疫活性的差异,例如大多数种群中由于雌虫的配子投入高于雄虫,在繁殖过程中雌虫向雄虫施加性选择压力,雄虫为了提高自身的繁殖适合度通过交配竞争争夺交配机会,雌虫通过延长寿命增强繁殖力,雌虫寿命的延长依赖于免疫系统活性的提升,此时雌虫通常具有较高的免疫活性(Bateman, 1948; Rolff, 2002);但是,在食物匮乏条件下的美洲大螽斯 *Kawanaphila nartee* Rentz 雌雄成虫在性选择过程中地位会发生改变,其雄虫的配子投入相对提高,而雌虫的配子投入相对降低,雌虫通过交配竞争争夺交配机会,此时雄虫表现出较高的免疫活性(Vincent and Gwynne, 2014)。此外,本实验中,为防止雌雄个体发生交配行为,将雌雄个体分开饲养,虽然饲养条件一致,但雌雄群体单独饲养也可能导致雌雄个体免疫水平的差异。本研究表明,免疫诱导后,雄虫显示出更加灵敏的免疫响应,这种现象在脊椎动物中也普遍存在(Zuk, 1990; Zuk and McKean, 1996),但在昆虫中还很少被证实。我们推测这种现象可能是由于雌虫免疫物质储备较多,当雌虫受到免疫诱导时,可以先消耗自身已有的免疫活性物质抵抗感染,因此进入免疫响应效应期较晚,而雄虫自身免疫物质储备较少,会迅速进入体液免疫响应的效应期,因此就可以表现出对免疫诱导的响应更为灵敏的现象,对于这一观点我们还没有足够的依据,一系列与其分子机制相关的表达调控的研究仍待进行。

有关昆虫免疫系统中 PO 和 AMPs 合成的相关生理机制和分子机制已经在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*

Giles、黄粉虫和棉铃虫等多种昆虫中进行过研究(张小玉等, 2006; Dobson *et al.*, 2012; 黄琼等, 2013; Rämet and Hultmark, 2014)。研究发现,昆虫免疫物质的合成是高耗能的,会对昆虫个体的体型体色(Dubovskiy *et al.*, 2013)、生长(Ardia *et al.*, 2012)、发育(Modak *et al.*, 2009)、繁殖(Reaney and Knell, 2010)和存活(Moret and Schmid-Hempel, 2000)等产生很大影响,这种现象被称为免疫权衡现象(immune trade-off)。免疫诱导后,昆虫体内免疫物质会在随后较长一段时间内维持较高水平,当昆虫再次受到相似病原菌侵染时仍然可以保持自身具有较高的抵抗力(Cisarovsky *et al.*, 2012),同时也有部分免疫物质会通过繁殖行为传递到后代,提高下一代免疫力(Shi *et al.*, 2014),比如人们在许多昆虫雌虫所产的卵中检测到了抑菌物质的存在(Moret, 2006; Sadd and Schmid-Hempel, 2009; Moreau *et al.*, 2012; Jacobs and Zee, 2013),在雄虫排出的精子中也发现了大量的抑菌物质的存在(Avila *et al.*, 2011),这些现象被称为免疫致敏现象(immune priming)。免疫权衡现象和免疫致敏现象都与昆虫免疫适应性相关。目前,我们已经获得了水椰八角铁甲转录组序列,并成功克隆到多种与 PO 和 AMPs 相关的基因,这些工作基础都将为我们解释入侵生物免疫适应性相关变异,探寻安全有效的生物防治方法提供重要帮助。

## 参考文献(References)


Ardia DR, Gantz JE, Schneider BC, Strebel S, 2012. Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology*, 26(3): 732-739.

Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF, 2011. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*, 56: 21-40.

Bateman A, 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(3): 349-368.

Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS, 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(8): 669-679.

Cisarovsky G, Koch K, Schmid-Hempel P, 2012. A field study on the influence of food and immune priming on a bumblebee-gut parasite system. *Oecologia*, 170(3): 877-884.

Cotter SC, Kruuk LEB, Wilson K, 2004. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(2): 421-429.

Dobson AJ, Johnston PR, Vilcinskas A, Rolff J, 2012. Identification of immunological expressed sequence tags in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*, 58(12): 1556-1561.

Dubovskiy IM, Whitten MMA, Kryukov VY, Yaroslavtseva ON, Grizanova EV, Greig C, Mukherjee K, Vilcinskas A, Mitkovets PV, Glupov VV, Butt TM, 2013. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 280(1763): 1-10.

Fanson BG, Fanson KV, Taylor PW, 2013. Sex differences in insect immune function: a consequence of diet choice? *Evolutionary Ecology*, 27(5): 937-947.

Gong X, Le GW, Shi YH, 2004. Physiological activity of insect antibacterial peptides and its application in transgenic research. *Entomological Knowledge*, 41(2): 110-115. [宫霞, 乐国伟, 施用晖, 2004. 昆虫抗菌肽的生理活性及其转基因应用前景. 昆虫知识, 41(2): 110-115]

González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A, 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1): 1-16.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418): 1313-1318.

Hou YM, Miao YX, Zhang ZY, 2014a. Study on life table parameters of the invasive species *Octodonta nipae* (Maulik) (Coleoptera: Chrysomelidae) on different palm species, under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 107(4): 1486-1495.

Hou YM, Miao YX, Zhang ZY, 2014b. Leaf consumption capacity and damage projection of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) on three palm species. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(5): 1010-1017.

Hou YM, Weng ZQ, 2010. Temperature-dependent development and life table parameters of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 39(5): 1676-1684.

Hou YM, Wu ZJ, Wang CF, 2011. The status and harm of biological invasion in Fujian, China. In: Xie LH, You MS, Hou YM eds. Biological Invasions: Problems and Countermeasures. Science Press, Beijing. 111-114. [侯有明, 吴祖建, 王长方, 2011. 福建生物入侵现状与危害. 见: 谢联辉, 尤民生, 侯有明 编著. 生物入侵: 问题与对策. 北京: 科学出版社. 111-114]

Hua RX, Hou YM, Shi ZH, 2014. Changes in the contents of physiologically active substances in *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) after low temperature acclimation. *Acta Entomologica Sinica*, 57(3): 265-273. [华瑞香, 侯有明, 石章红, 2014. 低温驯化后水椰八角铁甲生理活性物质含量的变化. 昆虫学报, 57(3): 265-273]

Huang Q, Hu J, Wang Q, 2013. Cloning, bioinformatic analysis and expression profiling of the prophenoloxidase cDNA from two color varieties of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 594-604. [黄琼, 胡杰, 王勤, 2013. 两种色型黄粉虫酚氧化酶原的 cDNA 克隆、生物信息学分析及表达水平检测. 昆虫学报, 56(6): 594-604]

Huang SC, Qin WQ, Zhou HQ, Ma ZL, Li CX, 2007. Study on

reproductive biology of *Tetrastichus brontispae*. *Entomological Journal of East China*, 16(3): 168–171, 238. [黄山春, 覃伟权, 周焕起, 马子龙, 李朝绪, 2007. 椰心叶甲啮小蜂的繁殖生物学研究. 华东昆虫学报, 16(3): 168–171, 238]

Jacobs CGC, Zee MVD, 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(2): 263–269.

Kurtz J, Wiesner A, Götz P, Sauer KP, 2000. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Developmental and Comparative Immunology*, 24(1): 1–12.

Laughton AM, Siva-Jothy MT, 2011. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 42(2): 140–149.

Lazzaro BP, 2008. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3): 284–289.

Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A, 2011. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, 334(6054): 362–365.

Lu HS, 2008. Principles of Insect Immunology. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai. 21–41. [吕鸿声, 2008. 昆虫免疫学原理. 上海: 上海科学技术出版社. 21–41]

Lu J, Zhong Y, Liu L, Fu K, Chen ZW, 2007. Optimization of extraction technique for antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 50(1): 106–112. [陆婕, 钟雍, 柳林, 付康, 陈正望, 2007. 家蝇蛆抗菌肽提取工艺研究. 昆虫学报, 50(1): 106–112]

Maulik S, 1921. A new hispid beetle injurious to nipa plam. *Annals and Magazine of Natural History*, 7(9): 451–452.

McNamara KB, Lieshout EV, Jones TM, Simmons LW, 2013. Age-dependent trade-offs between immunity and male, but not female, reproduction. *Journal of Animal Ecology*, 82(1): 235–244.

Modak SG, Satish KM, Mohan J, Dey S, Raghavedra N, Shakarad M, Joshi A, 2009. A possible tradeoff between developmental rate and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics*, 88(2): 253–256.

Moreau J, Martinaud G, Troussard JP, Zanchi C, Moret Y, 2012. Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. *Oikos*, 121(11): 1828–1832.

Moret Y, 2006. 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 273(1592): 1399–1405.

Moret Y, Schmid-Hempel P, 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, 290(5494): 1166–1168.

Nunn CL, Lindenfors P, Pursall ER, Rolff J, 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1513): 61–69.

Rämet M, Hultmark D, 2014. *Drosophila* immunity-Glorious past, dynamic present and exciting future. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1): 1–2.

Rantala MJ, Roff DA, 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology*, 19(2): 323–330.

Reaney LT, Knell RJ, 2010. Immune activation but not male quality affects female current reproductive investment in a dung beetle. *Behavioral Ecology*, 21(6): 1367–1372.

Rolff J, 2002. Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 269(1493): 867–872.

Sadd BM, Schmid-Hempel P, 2009. Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications*, 2(1): 113–121.

Schmid-Hempel P, 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 50: 529–551.

Shi ZH, Lin YT, Hou YM, 2014. Mother-derived trans-generational immune priming in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Dryophthoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 104(6): 742–750.

Shi ZH, Sun JH, 2010. Immunocompetence of the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): variation between developmental stages and sexes in populations in China. *Journal of Insect Physiology*, 56(11): 1696–1701.

Simmons LW, Roberts B, 2005. Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science*, 309(5743): 2031.

Siva-Jothy MT, Morte Y, Rolff J, 2005. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32: 1–48.

Sun JH, Yu PY, Zhang YZ, Wang XJ, 2003. A new invasive coconut pest in Hainan Province. *Entomological Knowledge*, 40(3): 286–287. [孙江华, 虞佩玉, 张彦周, 王小君, 2003. 海南省新发现的林业外来入侵害虫——水椰八角铁甲. 昆虫知识, 40(3): 286–287]

Tang BZ, Chen J, Hou YM, Meng E, 2014a. Transcriptome immune analysis of the invasive beetle *Octodonta nipae* (Maulik) (Coleoptera: Chrysomelidae) parasitized by *Tetrastichus brontispae* Ferrière (Hymenoptera: Eulophidae). *PLoS ONE*, 9(3): e91482.

Tang BZ, Xu L, Hou YM, 2014b. Traits of the parasitoid *Tetrastichus brontispae* (Hymenoptera: Eulophidae) on its pupae host *Octodont nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions. *BioControl*, 59(6): 647–657.

Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O, 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(2): 363–372.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS, 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25(6): 289–294.

Vincent CM, Gwynne DT, 2014. Sex-biased immunity is driven by relative differences in reproductive investment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 281(1790): 20140333.

Wu GQ, Zhao ZY, Liu CL, Qiu LH, 2014. Priming *Galleria mellonella*

(Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 559 – 569.

Xi B, Zhang ZY, Hou YM, Shi ZH, 2013. Effects of host plants on the developmental duration, feeding and reproduction of the nipa palm hispid, *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(7): 799 – 806. [席博, 张秩勇, 侯有明, 石章红, 2013. 寄主植物对水椰八角铁甲发育历期、取食和繁殖的影响. 昆虫学报, 56(7): 799 – 806]

Xu L, Lan JL, Hou YM, Chen YS, Chen ZX, Weng ZQ, 2011. Molecular identification and pathogenicity assay on *Metarhizium* against *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(4): 922 – 927. [徐利, 蓝江林, 侯有明, 陈玉森, 陈智雄, 翁章权, 2011. 感染水椰八角铁甲的绿僵菌的分子鉴定及致病力测定. 应用昆虫学报, 48(4): 922 – 927]

Zanchi C, Troussard JP, Moreau J, Moret Y, 2012. Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 279 (1741): 3223 – 3230.

Zhang XY, Xu XY, Zhang JY, Wang GX, Liu XS, 2006. cDNA cloning, sequence analysis and tissue expression of a prophenoloxidase gene in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 49 (3): 363 – 366. [张小玉, 徐晓宇, 张俊彦, 王国秀, 刘绪生, 2006. 棉铃虫酚氧化酶原基因的克隆、序列分析和组织表达. 昆虫学报, 49(3): 363 – 366]

Zuk M, 1990. Reproductive strategies and sex differences in disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitol. Today*, 6(7): 231 – 233.

Zuk M, McKean KA, 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 26 (10): 1009 – 1023.

（责任编辑：赵利辉）